

Propriétés neuroprotectrices, antioxydantes et anti-apoptotiques du resvératrol dans des neurones dopaminergiques en milieu hyperglycémique



Julie Bournival, Marc-André Francoeur, Fanny Longpré, Justine Renaud et Maria-Grazia Martinoli
Laboratoire de recherche en neurobiologie cellulaire, Université du Québec à Trois-Rivières



INTRODUCTION

Le resvératrol (fig.1) est un phytoestrogène reconnu pour ses effets anticancéreux et cardioprotecteurs. Plusieurs travaux suggèrent que ce polyphénol naturel, notamment retrouvé dans le vin rouge, possède des propriétés antioxydantes qui pourraient réduire la formation de radicaux libres dans le cerveau menant au stress oxydant et, ultimement, à l'apoptose des neurones.

La maladie de Parkinson (MP) est un trouble du système moteur caractérisé par la déplétion progressive des neurones dopaminergiques (DAergiques) de la voie nigro-striée. En parallèle, l'hyperglycémie constitue une cause de stress oxydant que la littérature associe au développement de dommages au système nerveux liés à certaines maladies neurodégénératives comme la MP.

Les buts de notre étude :

1. évaluer l'effet du resvératrol sur la cascade apoptotique dans des neurones DAergiques en milieu hyperglycémique
2. évaluer l'effet du resvératrol contre l'oxydation des neurones DAergiques en culture induite par l'hyperglycémie

MÉTHODOLOGIE

Culture et traitement des cellules

Les cellules neuronales DAergiques PC12 (fig.2) étaient cultivées à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂ dans du milieu RPMI supplémenté de sérum bovin fœtal 5% et de sérum de cheval 10%. Leur différenciation était induite par le NGF-7S (nerve growth factor). Les cellules différenciées étaient traitées avec du milieu hyperglycémique (DMEM-HG) pendant 96 h. Le resvératrol 10⁻⁷ M était ajouté en co-traitement aux puits 24 h avant la fin du traitement hyperglycémique.

Mesure de la cytotoxicité

La mort cellulaire était quantifiée par une analyse colorimétrique (fig.3) qui mesure l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) relâchée dans le milieu extracellulaire par les cellules endommagées. Suite au traitement des cellules, les surnageants étaient prélevés afin d'y doser la LDH à l'aide d'une solution contenant un sel de tétrazolium, du NAD⁺ et de l'acide lactique. L'absorbance était lue à 490 nm.

Dosage de la fragmentation de l'ADN

Le dosage de la fragmentation de l'ADN, dernier événement de la cascade apoptotique (fig.4), était effectué à l'aide d'une analyse ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) qui emploie un anticorps spécifique contre l'ADN simple brin issu de cette fragmentation. À la fin du traitement, les cellules préalablement comptées, fixées et traitées étaient incubées avec un anticorps. La fragmentation de l'ADN était dosée à l'aide d'une réaction enzymatique colorimétrique et l'absorbance était lue à 405 nm.

Dosage des protéines

L'expression des protéines pro-apoptotique, BAX, et anti-apoptotique, Bcl-2, était évaluée par immunobuvardage de type Western. Les protéines totales étaient extraites et dosées pour ensuite subir une électrophorèse SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Les protéines étaient transférées sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) pour être incubées avec les anticorps d'intérêt. Les bandes indiquant la présence de protéines étaient révélées par chimiluminescence.

Dosage de l'anion superoxyde

La production d'anion superoxyde (O_2^-) dans les mitochondries des cellules neuronales était dosée à l'aide de MitoSOX Red (fig.5), un fluorophore liant spécifiquement cette espèce réactive de l'oxygène. Suite au traitement des cellules, celles-ci étaient fixées et incubées avec le MitoSOX Red tandis que les noyaux étaient colorés avec le fluorophore Hoechst. La fluorescence était détectée à 590 nm.

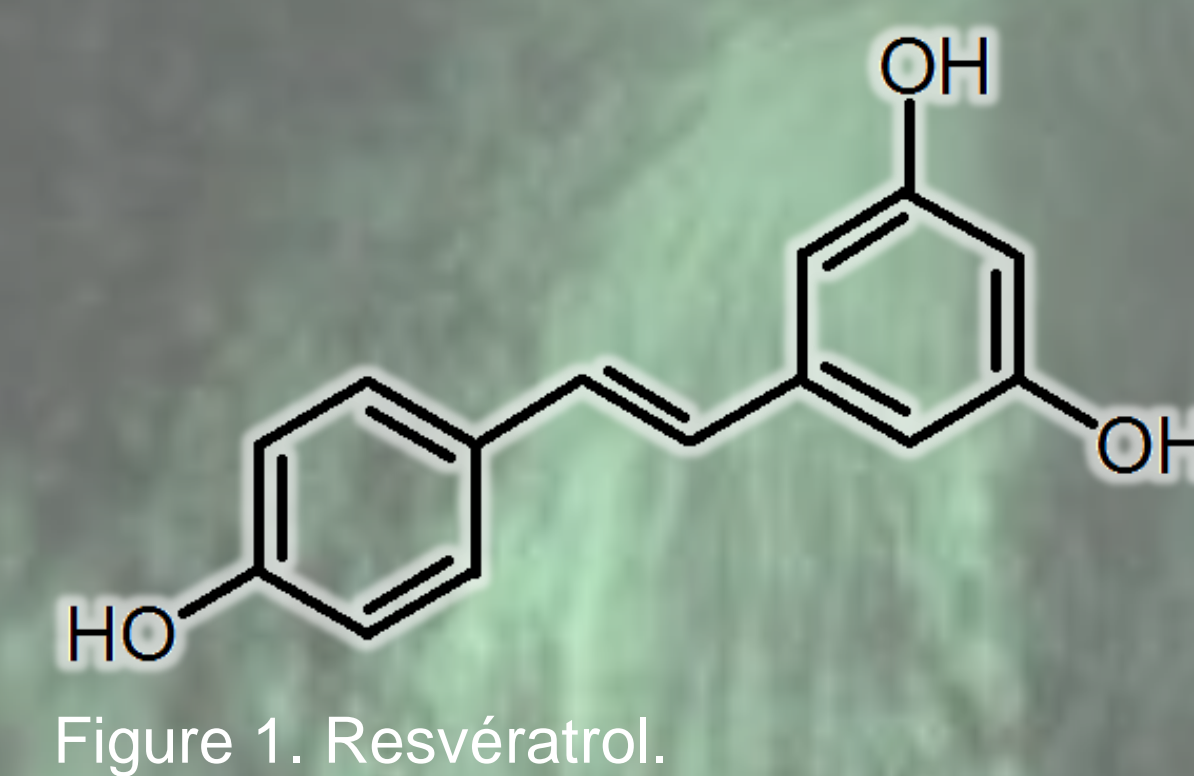


Figure 1. Resvératrol.

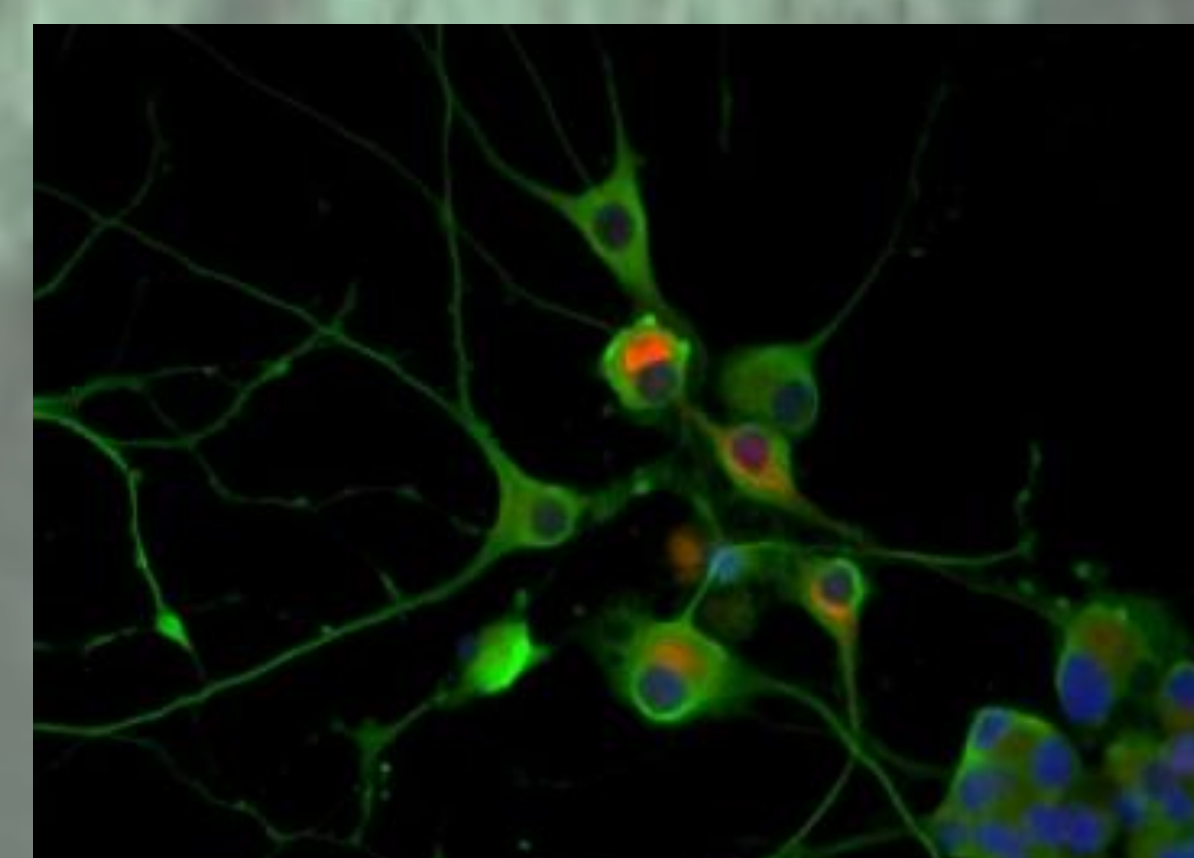


Figure 2. Cellules PC12 différenciées.

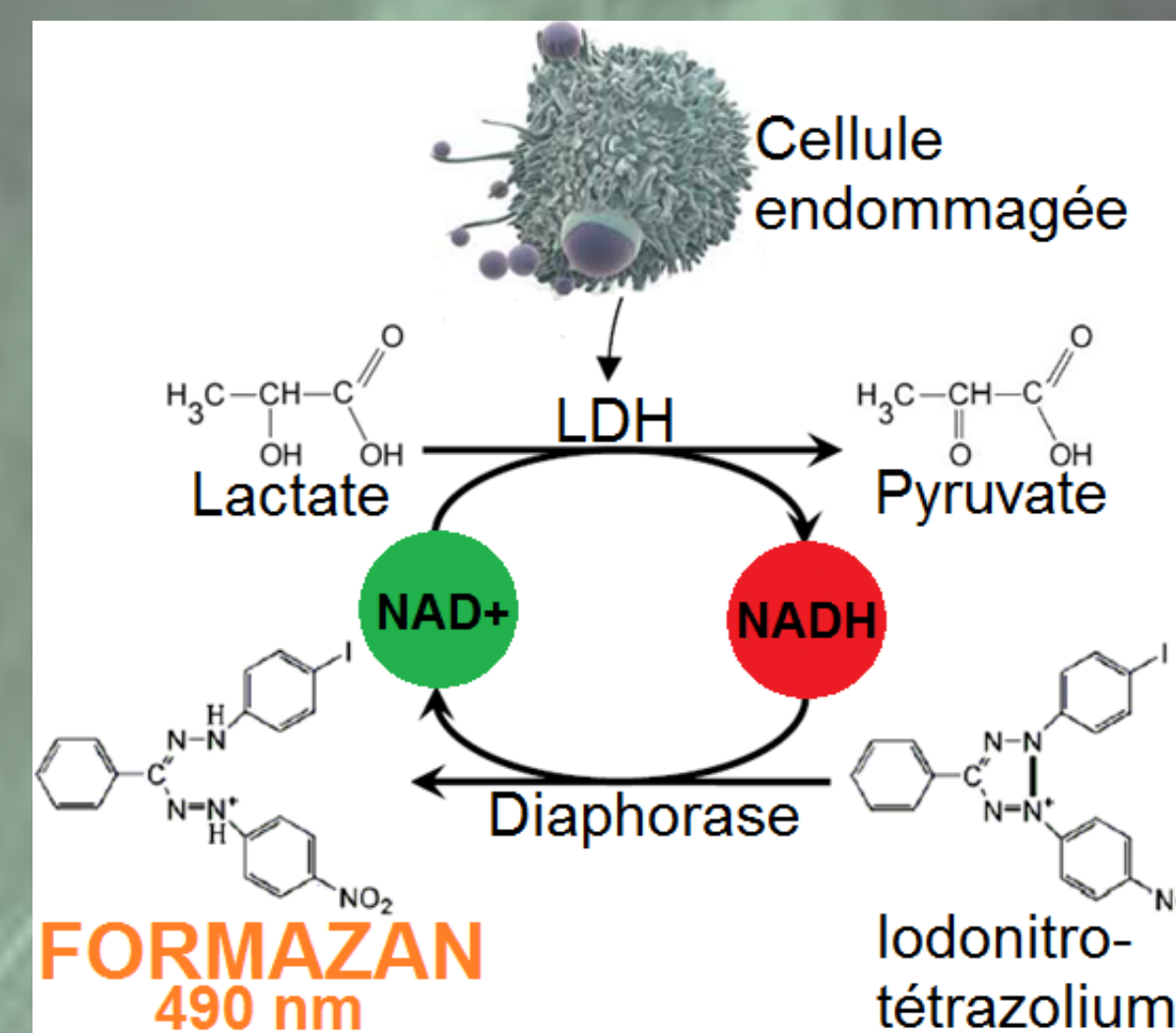


Figure 3. Mesure de la cytotoxicité.

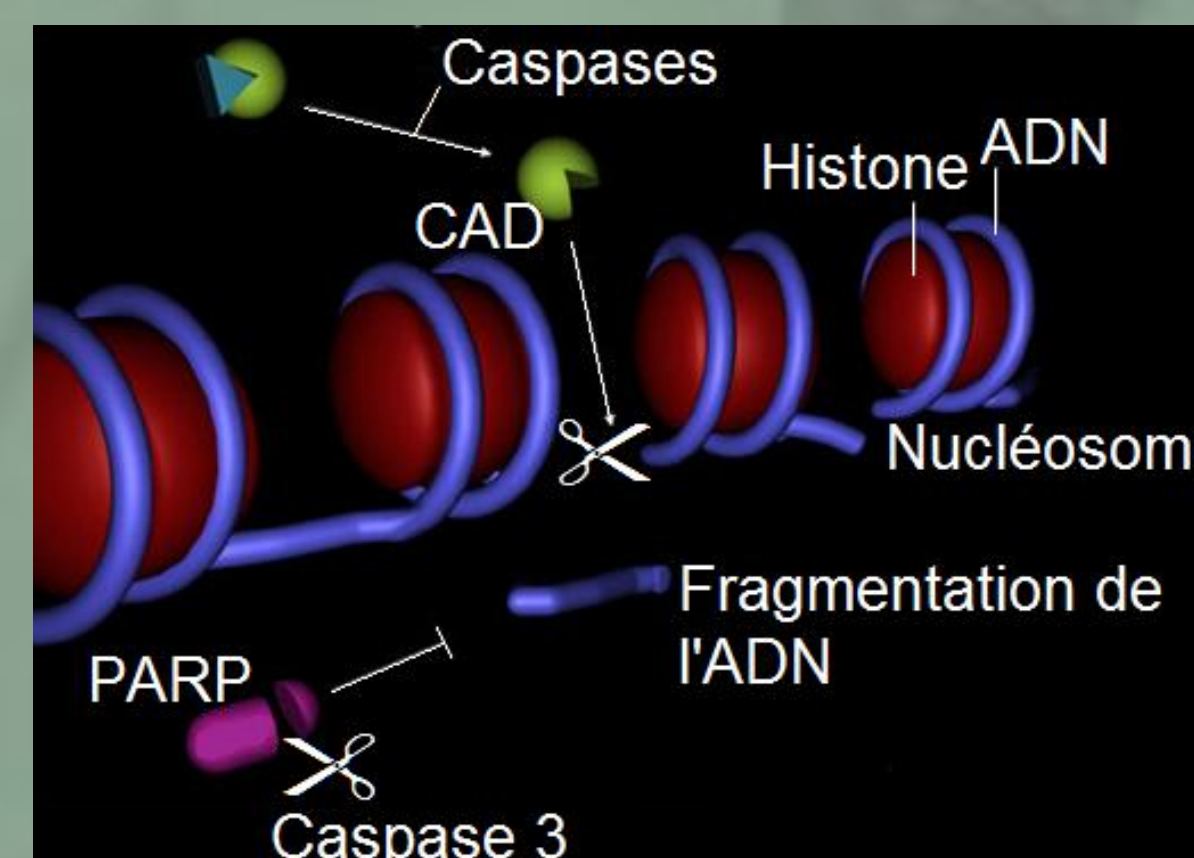


Figure 4. Fragmentation de l'ADN.

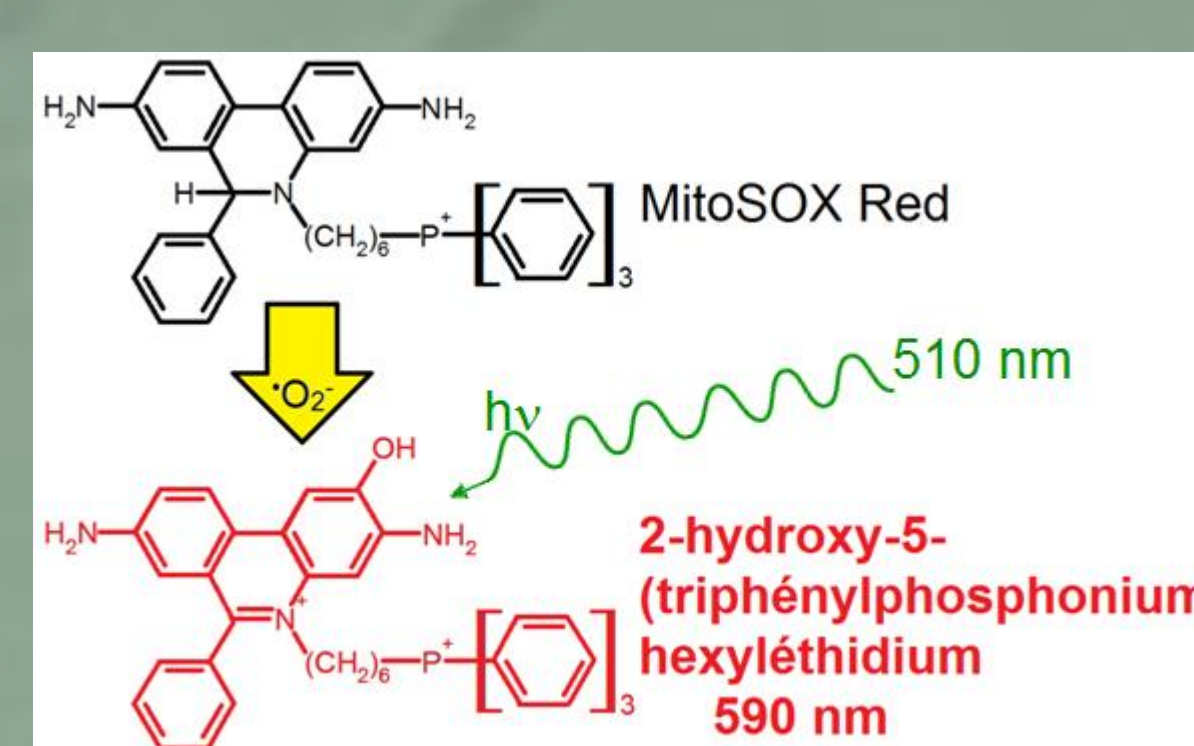


Figure 5. Dosage de l'anion superoxyde.

RÉSULTATS

Pour tous les résultats: *** P<0,001, ** P<0,01, * P<0,05 à comparer au contrôle et +++ P<0,001, ++ P<0,01, + P<0,05 à comparer à la condition HG.

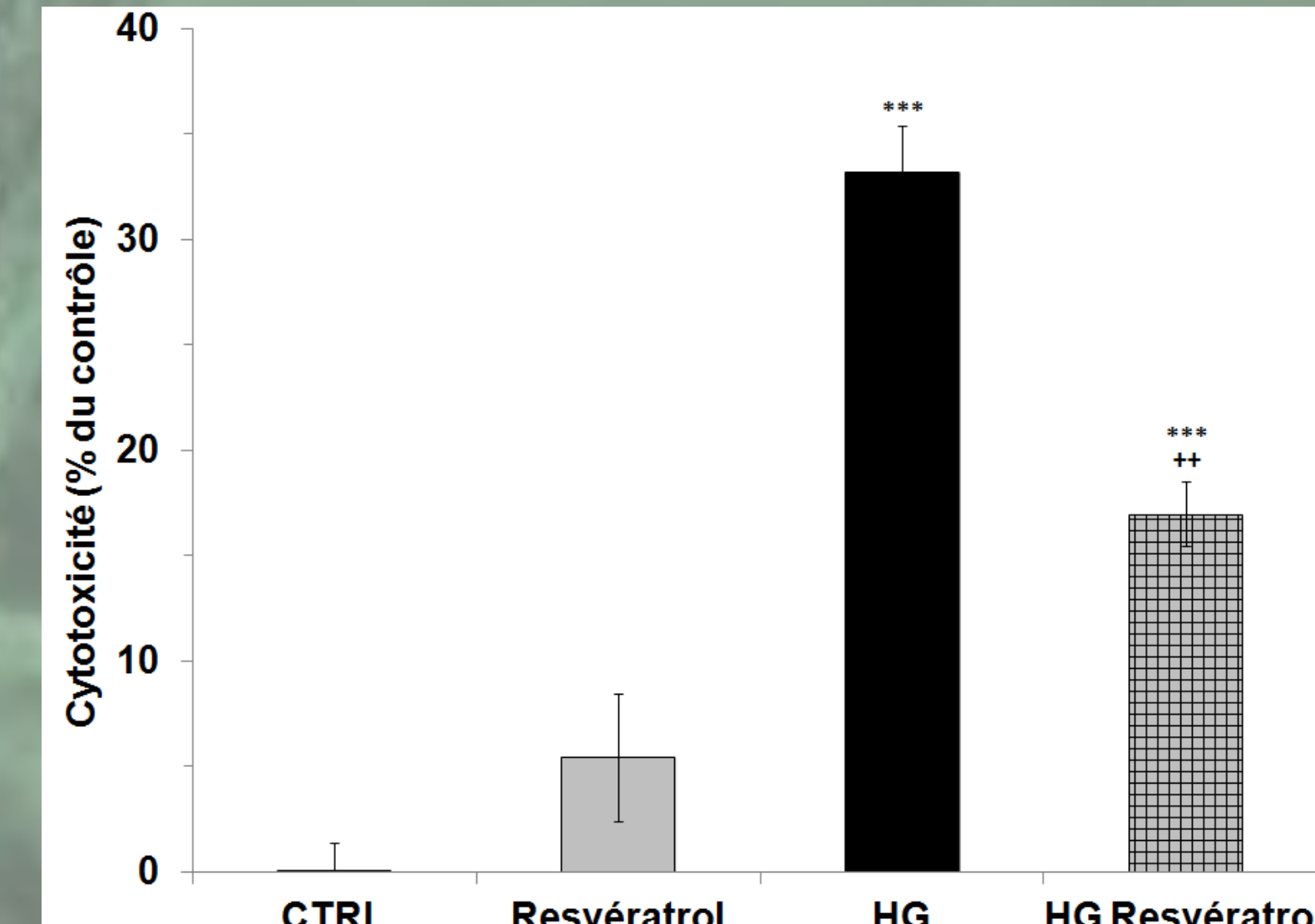


Figure 6. Effet du resvératrol sur la mort neuronale. Le resvératrol a des propriétés neuroprotectrices, car il réduit de 48% la cytotoxicité des neurones induite par l'hyperglycémie.

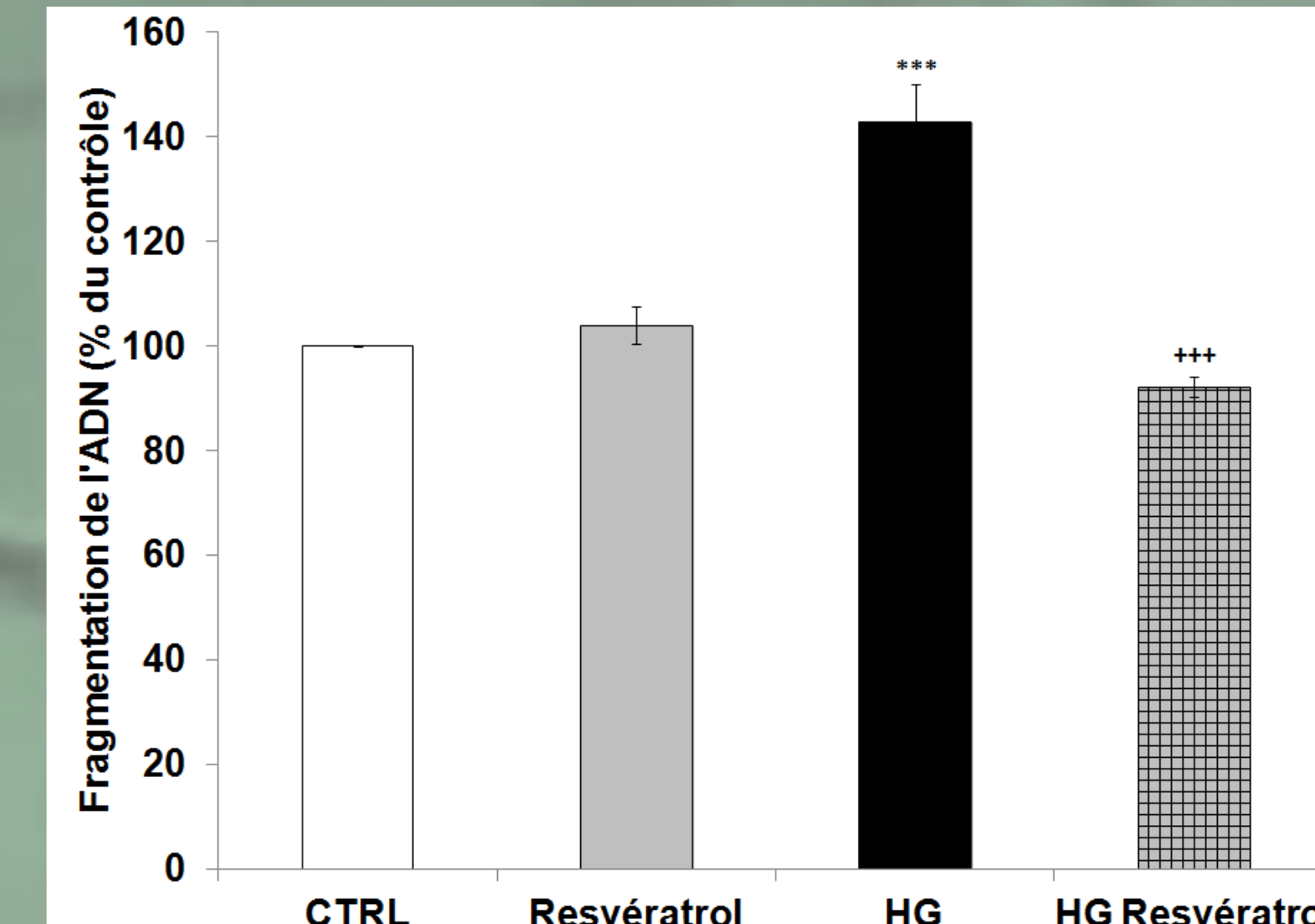


Figure 7. Effet du resvératrol sur la fragmentation de l'ADN. Le resvératrol est anti-apoptotique en diminuant de 36% la fragmentation de l'ADN neuronal induite par l'hyperglycémie.

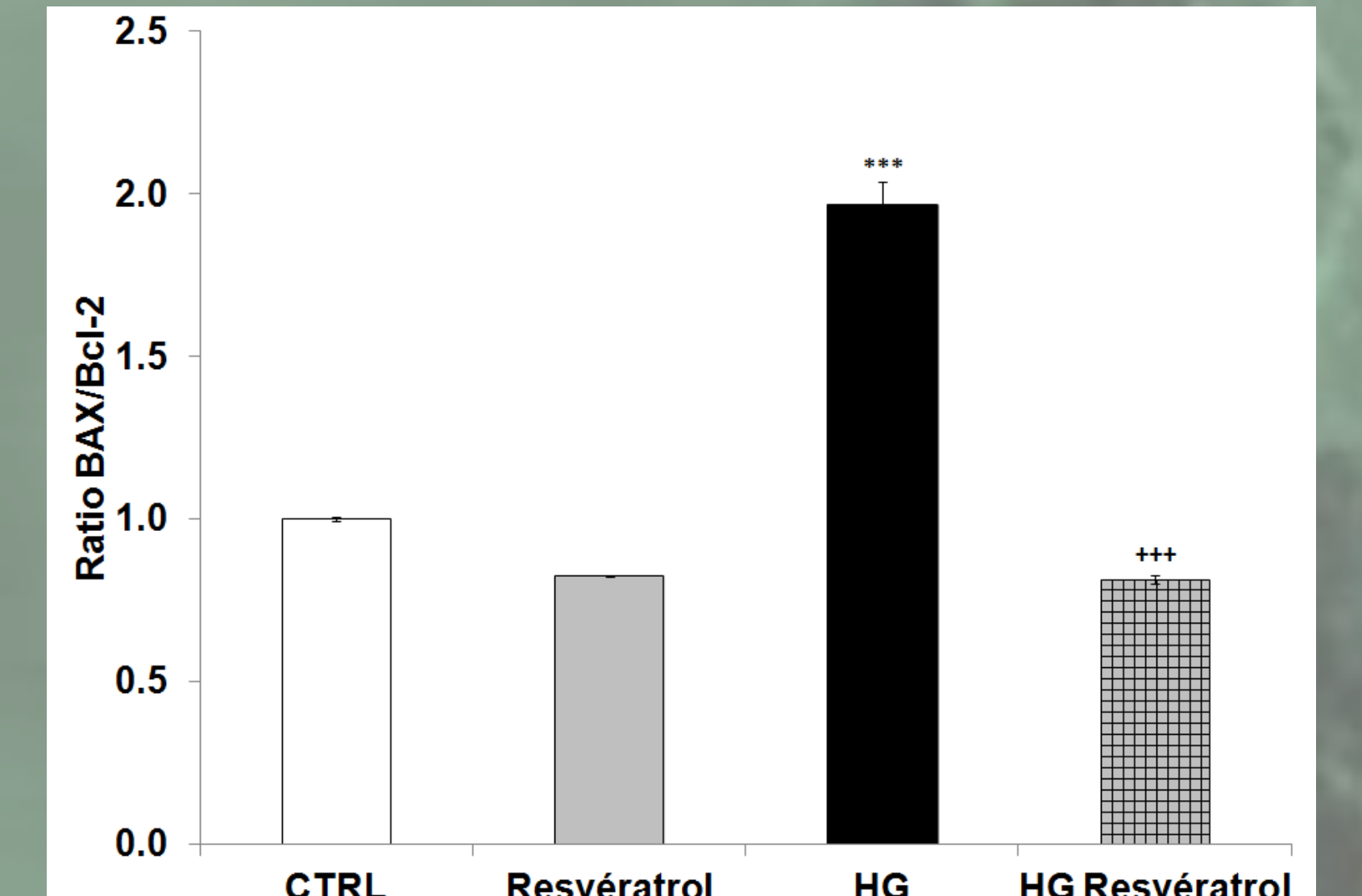


Figure 8. Effet du resvératrol sur l'apoptose des neurones. Le resvératrol est anti-apoptotique, car il diminue de 60% le ratio BAX/Bcl-2 dans les neurones traités avec le milieu hyperglycémique.

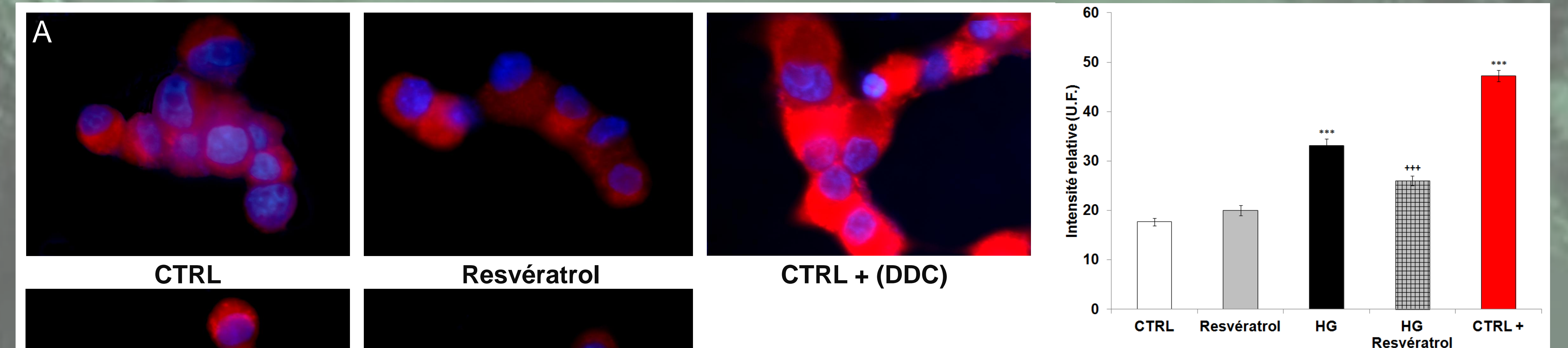


Figure 9. Effet du resvératrol sur l'oxydation des neurones. Le resvératrol possède des propriétés antioxydantes, car il diminue les niveaux d'anion superoxyde de 21% dans les mitochondries des cellules neuronales traitées avec le milieu hyperglycémique.

CONCLUSION

Nos résultats démontrent clairement que le resvératrol exerce un rôle protecteur dans les cellules neuronales DAergiques soumises à un traitement hyperglycémique. Tout d'abord, le dosage de la LDH met en évidence que le resvératrol diminue de manière significative le taux de mortalité des neurones DAergiques traités avec le milieu hyperglycémique. De plus, le resvératrol a un effet anti-apoptotique sur les cellules neuronales soumises à un stress hyperglycémique comme le témoignent l'analyse de la fragmentation de l'ADN et le dosage de l'expression des gènes pro- et anti-apoptotiques, BAX et Bcl-2. D'autre part, nos résultats suggèrent que le resvératrol protège les neurones DAergiques contre le stress oxydant induit par l'hyperglycémie en réduisant les niveaux de radicaux libres produits dans les cellules. **Ces résultats mettent en évidence le lien entre hyperglycémie et neurodégénérescence, ce qui jette une nouvelle lumière sur l'incidence élevée du diabète chez les patients atteints de la MP. À long terme, l'intérêt de ces recherches résidera dans la possibilité de développer des traitements complémentaires ou préventifs dans la MP basés sur les propriétés antioxydantes et anti-apoptotiques des molécules naturelles, tel le resvératrol.**

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été financés par une subvention octroyée au Dre Maria-Grazia Martinoli par le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie (CRSNG), ainsi que par une bourse du Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) accordée à Julie Bournival.